

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

FEDERAL INSTITUTE OF INDUSTRIAL PROPERTY**N . 97117182**

1. A method of detecting a target nucleotide sequence present in a biological sample, comprising the following steps: a) obtaining a nucleic acid molecule from a biological sample; b) hybridizing a detector oligonucleotide from an immobilized nucleic acid molecule and removing non-hybridized detector oligonucleotide; d) ionizing and evaporating a product from step b); and c) detecting the detector oligonucleotide with the aid of mass-spectrometry, wherewith detection of the detector oligonucleotide indicates the presence of a target nucleotide sequence in the biological sample.

2. A method of detecting a target nucleotide sequence present in a biological sample, comprising the following steps: a) obtaining a target nucleic sequence from a biological sample; b) specifically digesting a molecule of replicated nucleic acid with use of at least one suitable nuclease by means of which digested fragments are obtained; and c) analyzing digested fragments with the aid of mass-spectrometry, wherewith determination of the molecular weight of the digested fragments provides information on the target nucleotide sequence.

3. A method of detecting a target nucleotide sequence present in a biological sample, normal or mutant, comprising the following steps: a) obtaining a nucleic acid molecule containing a target nucleotide sequence from the biological sample; b) hybridizing the target nucleotide sequence with a mutant primer (M) which is capable of hybridizing with mutation comprising a part of the target nucleotide sequence or a normal primer (N) which differs from M and is capable of hybridizing with a wild type sequence in the same part of the target as M; c) contacting a product from step b) with a corresponding polymerase enzyme and corresponding nucleoside triphosphate so that extension from N occurs where N hybridizes with the target nucleotide sequence or extension from M occurs where M hybridizes with the target nucleotide sequence; d) ionizing and evaporating the product from step c); and e) detecting the product of step d) with the aid of mass-spectrometry, wherewith the molecular weight of the product indicates that the target nucleotide sequence is normal or mutant.

4. A method of detecting a target nucleotide sequence present in a biological sample, comprising the following steps: a) obtaining a nucleic acid molecule containing target nucleotide(s); b) hybridizing the nucleic acid molecule with oligonucleotide-primer which is complementary to the nucleic acid molecule in the region right after a 5'-end of the target

nucleotide(s); c) contacting a product from step b) with a corresponding set of dideoxy nucleoside or 2'-desoxy-nucleoside triphosphates and DNA-dependent DNA-polymerase so that extension of the primer occurs by target nucleotide(s) with the formation of an extended primer product; d) ionizing and evaporating the product from step c); and e) detecting an extended product with the aid of mass-spectrometry to determine the identity of the target nucleotide(s).

5. A method of detecting a normal or mutant fragment of nucleic acid, comprising the following steps: a) obtaining a nucleic acid molecule; b) hybridizing the nucleic acid molecule with an oligonucleotide probe which is hybridized with a wild type or mutant sequence of nucleic acid; c) contacting a product from step b) with a single chain specific endonuclease; d) ionizing and evaporating a product from step c); and e) detecting the obtained products with the aid of mass-spectrometry, wherewith the presence of more than one different peak, representing more than one fragment shows that the nucleic acid molecule contains at least one mutation and the presence of one peak that is one nucleic acid indicates a wild type target nucleic acid.

6. A method of detecting at least one base in a target nucleotide sequence present in a biological sample, comprising the following steps: a) obtaining nucleic acid containing a target nucleotide sequence from a biological sample; b) carrying out at least one hybridization of the target nucleotide sequence with a set of ligation adducts and with a thermoresistant DNA-ligase, with the aid of which a ligation product is formed; c) ionizing and evaporating a product from step b); and d) detecting the ligation product with the aid of mass-spectrometry and comparing the obtained value with a known value to determine at least one base in the target nucleotide sequence.

7. The method according to claims 1 - 6, characterized in that prior to step b) the target nucleotide sequences are immobilized on a solid carrier to obtain immobilized target nucleotide sequences, nucleotide(s).

8. The method according to claim 7, characterized in that the immobilization is carried out with the aid of hybridization between a molecule of a complementary nucleic capture acid, which is preliminarily immobilized on the solid carrier, and a part of the nucleic acid molecule, which is different from the target nucleotide sequence.

9. The method according to claim 7, characterized in that the immobilization is carried out by direct binding of a solid substrate to a part of the nucleic acid molecule, that differs from the target nucleotide sequence.
10. The method according to claim 7, characterized in that the immobilization is reversible.
11. The method according to claim 10, characterized in that the target nucleic acid is moved from the solid substrate by means of a chemical, enzymatic or physical method.
- ~~12. The method according to claim 10, characterized in that immobilization is carried out by means of a photocleavable bond.~~
13. The method according to claim 10, characterized in that the target nucleotide sequence is moved from the substrate by ionization and evaporation.
14. The method according to claim 7, characterized in that the solid substrate is selected from the group including balls, flat surfaces, "Chips," capillaries, studs, ridges and "wafers."
15. The method according to claim 7, characterized in that the step of immobilizing is carried out by hybridization between a row of molecules of a complementary nucleic capture acid, which is preliminarily immobilized on a solid carrier, and a part of the nucleic acid molecule, which differs from the target nucleotide sequence.
16. The method according to any one of claims 1 - 6, characterized in that prior to step b) the step of amplification is carried out on the target nucleic acid.
17. The method according to claim 16, characterized in that the target nucleic acid is amplified by a method of amplification selected from the group consisting of cloning, transcription, polymerase chain reaction (PCR), ligase chain reaction (LCR) and strand displacement amplification (SDA).
18. The method according to claim 16, characterized in that a mass-spectrometer is selected from the group of instruments operating on the base of time-of-flight matrix laser desorption/ionization (MALDI-TOF), electronic sprayer (ES), ionic cyclotron resonance (ICR), Fourier transfer.
19. The method according to claims 1 - 6, characterized in that prior to ionization and evaporation the target nucleic acid is purified.

20. The method according to claims 1 – 6, characterized in that a primer, extended primer, probe or ligated product is conditioned.

21. The method according to claim 20, characterized in that the primer, extended primer, probe or product of ligation is conditioned by modification of a phosphodiester skeleton.

22. The method according to claim 21, characterized in that modification of the phosphodiester skeleton is a cation exchange.

23. The method according to claim 20, characterized in that the primer, extended primer, probe or product of ligation is conditioned by contact with an alkylating agent or trialkylsilyl chloride.

24. The method according to claim 20, characterized in that the primer, extended primer, probe or product of ligation is conditioned with the aid of at least one nucleotide which reduces sensitivity to depurination.

25. The method according to claim 24, characterized in that the nucleotide is N 7 – or N 9 – desazapurine nucleotide or 2' fluoro 2' desoxynucleotide.

26. The method according to claims 1 – 6, characterized in that the target nucleotide sequence indicates the illness or condition selected from the group including a genetic disease, chromosome anomaly, genetic predisposition, cancer or infection.

27. The method according to claim 6, characterized in that the first or second adduct of ligation for each DNA thread comprises 5'-phosphate.

28. The method according to claim 6, characterized in that it is carried out cyclically with the obtainment of an amplified product of ligation in accordance with which detection is carried out.

29. The method according to claim 6, characterized in that the ligase is a thermostable DNA ligase.

30. The method according to claims 1 – 6, characterized in that mass-spectrometry is matrix associated laser desorption (MALDI).

No. 97117182/13

ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИНСТИТУТ ПРОМЫШЛЕННОЙ
СОБСТВЕННОСТИ

Выбор баз данных	
Параметры поиска	(110) Номер публикации 97117182 - <i>publication number</i>
Формулировка запроса	(130) Вид документа A
Уточненный запрос	(140) Дата публикации 1999.08.20 <i>the publication date</i>
Найденные документы	(190) Страна публикации RU - <i>Country of publication</i>
Корзина	(210) Регистрационный номер заявки 97117182/13 - <i>Number of application</i>
Сохраненные запросы	(220) Дата подачи заявки 1997.10.17 - <i>Date of filing of application</i>
Статистика	(310) Номер конвенционной заявки 08/406,199 - <i>number of conventional application</i>
Помощь	(320) Дата подачи конвенционной заявки 1995.03.17 - <i>Date of filing of conventional application</i>
Предложения	(330) Страна приоритета US - <i>Country of priority</i>
Выход	(430) Дата публикации заявки 1999.08.20 <i>Date of publication of application</i>
	(516) Номер редакции МПК C12Q1/68 <i>CLASS</i>
	(511) Основной индекс МПК ДИАГНОСТИКА ДНК-ПОВРЕЖДЕНИЙ НА ОСНОВЕ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ <i>Title of invention</i>
ДОКУМЕНТ	Секвенном, Инк. (US) <i>name of the Applicant</i>
в начало	Хьюберт Костер (US)
в конец	Кай Танг (US)
в корзину	Донг-Джинг Фу (US)
печать	Карстен В.Сиегирт (DE)
ТЕРМИНЫ	Дэниел П.Литтл (DE)
ПРЕДВАРИТЕЛЬНЫЕ ССЫЛКИ	Дж. Скотт-Хиггинс (DE)
	Андреас Браун (DE)
	Бриджитт Дарнхофер-Демар (DE)
	Кристиан Юринке (DE)
	Миц А.В.
	Лебедева Н.Г.
	US 96/03651 (18.03.96)
	103735, Москва, ул.Ильинка 5/2, Союзпатент

Inventors

ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИНСТИТУТ ПРОМЫШЛЕННОЙ СОБСТВЕННОСТИ

Патент

№97117182. Реферат

Выбор баз данных
Параметры поиска
Формулировка запроса
Уточненный запрос
Найденные документы
Корзина
Сохраненные запросы
Статистика
Помощь
Предложения
Выход

1. Способ обнаружения мишенной нуклеотидной последовательности, присутствующей в биологическом образце, включающий стадии а) получения молекулы нуклеиновой кислоты из биологического образца; б) гибридизации детекторного олигонуклеотида с иммобилизованной молекулой нуклеиновой кислоты и удаление негибридизованного-детекторного-олигонуклеотида; г) ионизации и испарения продукта со стадии б); и д) обнаружения детекторного олигонуклеотида с помощью масс-спектрометрии, при этом обнаружение детекторного олигонуклеотида указывает на присутствие мишенной нуклеотидной последовательности в биологическом образце.

2. Способ обнаружения мишенной нуклеотидной последовательности, присутствующей в биологическом образце, включающий стадии а) получения мишенной нуклеотидной последовательности из биологического образца; б) специфического переваривания молекулы реплицированной нуклеиновой кислоты с использованием по меньшей мере, одной подходящей нуклеазы, посредством чего получают переваренные фрагменты; и в) анализа переваренных фрагментов с помощью масс-спектрометрии, при этом определение молекулярной массы переваренных фрагментов дает информацию о мишенной нуклеотидной последовательности.

Документ
в начало
в конец
в корзину
печать

3. Способ обнаружения мишенной нуклеотидной последовательности, присутствующей в биологическом образце; нормальном или мутантном, включающий стадии а) получения молекулы нуклеиновой кислоты, содержащей мишенную нуклеотидную последовательность, из биологического образца; б) гибридизации мишенной нуклеотидной последовательности с мутантным праймером (М), который способен гибридизоваться с мутацией, содержащей часть мишенной нуклеотидной последовательности или нормального праймера (N), который отличается от М и способен гибридизоваться с последовательностью дикого типа в той же части мишени, что и М; в) контактирования продукта со стадии б) с соответствующим ферментом полимеразой и соответствующим нуклеозидтрифосфатом так, что удлинение от N происходит, если N гибридизуется с мишенной нуклеотидной последовательностью или удлинение от М происходит, если М гибридизуется с мишенной нуклеотидной последовательностью; г) ионизации и испарения продукта со стадии в); и д) обнаружения продукта стадии г) с помощью масс-спектрометрии, при этом молекулярная масса продукта указывает на то, что мишенная нуклеотидная последовательность является нормальной или мутантной.

4. Способ обнаружения мишенной нуклеотидной последовательности, присутствующей в биологическом образце.

включающий стадии а) получения молекулы нуклеиновой кислоты, содержащей мишень (е) нуклеотид(ы) б) гибридизации молекулы нуклеиновой кислоты с олигонуклеотидом - затравкой (праймером) который комплементарен к молекуле нуклеиновой кислоты в области сразу за 5'-концом мишенного нуклеотида(ов) в) контактирования продукта со стадии б) с соответствующим набором дидезоксинуклеозид или 2'-дезоксинуклеозидтрифосфатов и ДНК-зависимой ДНК-полимеразой, так что происходит удлинение праймера мишенным (и) нуклеотидом(ами) с образованием удлиненного продукта праймера; г) ионизации и испарения продукта со стадии в); и д) обнаружения удлиненного продукта с помощью масс-спектрометрии, для определения идентичности мишенного нуклеотида(ов).

5. Способ обнаружения нормального или мутантного фрагмента нуклеиновой кислоты, включающий стадии а) получения молекулы нуклеиновой кислоты; б) гибридизации молекулы нуклеиновой кислоты с олиго-нуклеотидом-зондом, который гибридизируется с дикого типа или мутантной последовательностью нуклеиновой кислоты; в) контактирования продукта со стадии б) с одноцепочечной специфической эндонуклеазой; г) ионизации и испарения продукта со стадии в); и е) обнаружения полученных продуктов с помощью масс-спектрометрии, при этом наличие более одного различных пиков, представляющих более чем один фрагмент показывает, что молекула нуклеиновой кислоты содержит, по крайней мере, одну мутацию и присутствие одного пика, представляющего одну нуклеиновую кислоту указывает на мишенную нуклеиновую кислоту дикого типа.

6. Способ обнаружения, по крайней мере, одного основания в мишенной нуклеотидной последовательности, присутствующей в биологическом образце, включающий стадии а) получения нуклеиновой кислоты, содержащей мишенную нуклеотидную последовательность из биологического образца; б) осуществления, по меньшей мере, одной гибридизации мишенной нуклеотидной последовательности с набором аддуктов лигирования и термоустойчивой ДНК-лигазой, посредством чего образуется продукт лигирования; в) ионизации и испарения продукта со стадии б); и г) обнаружения продукта лигирования с помощью масс-спектрометрии и сравнения полученного значения с известным значением для определения, по крайней мере, одного основания в мишенной нуклеотидной последовательности.

7. Способ по пп. 1-6, отличающийся тем, что перед стадией б) мишенные нуклеотидные последовательности иммобилизуют на твердом носителе для получения иммобилизованных мишенных нуклеотидных последовательностей, нуклеотида(ов).

8. Способ по п. 7, отличающийся тем, что иммобилизацию осуществляют с помощью гибридизации между молекулой комплементарной нуклеиновой кислоты захвата, которая предварительно иммобилизована на твердом носителе, и частью молекулы нуклеиновой кислоты, которая отличается от мишенной нуклеотидной последовательности.

9. Способ по п. 7, отличающийся тем, что иммобилизацию осуществляют путем прямого связывания твердой подложки с частью молекулы нуклеиновой кислоты, которая отличается от мишенной нуклеотидной последовательности.
10. Способ по п. 7, отличающийся тем, что иммобилизация является обратимой.
11. Способ по п. 10, отличающийся тем, что мишенная нуклеиновая кислота удаляется с твердой подложки посредством химического, ферментатического или физического способов.
12. Способ по п. 10, отличающийся тем, что иммобилизацию осуществляют посредством фоторасщепляемой связи.
13. Способ по п. 10, отличающийся тем, что мишенная нуклеотидная последовательность удаляется с подложки путем ионизации и испарения.
14. Способ по п. 7, отличающийся тем, что твердую подложку выбирают из группы, включающей шарики, плоские поверхности, "чипсы", капилляры, шпильки, гребни и "вафли".
15. Способ по п. 7, отличающийся тем, что стадию иммобилизации осуществляют посредством гибридизации между рядом молекул комплементарной нуклеиновой кислоты захвата, которая предварительно иммобилизована на твердом носителе, и частью молекулы нуклеиновой кислоты, которая отличается от мишенной нуклеотидной последовательности.
16. Способ по любому из пп. 1-6, отличающийся тем, что до стадии б) стадию амплификации осуществляют на мишенной нуклеиновой кислоте.
17. Способ по п. 16, отличающийся тем, что мишенную нуклеиновую кислоту амплифицируют методом амплификации, выбранным из группы, состоящей из клонирования, транскрипции, полимеразной цепной реакции (PCR), лигазной цепной реакции (LCR) и амплификации с замещением цепи (SDA).
18. Способ по п. 16, отличающийся тем, что масс-спектрометр выбирают из группы приборов, работающих на основе времяпролетной матричной лазерной десорбции/ионизации (MALDI-TOF), электронного распыления (ES), ионного циклотронного резонанса (ICR), переноса Фурье.
19. Способ по пп. 1-6, отличающийся тем, что до ионизации и испарения мишенную нуклеиновую кислоту очищают.
20. Способ по пп. 1-6, отличающийся тем, что праймер, удлиненный праймер, зонд, или продукт лигирования кондиционируют.
21. Способ по п. 20, отличающийся тем, что праймер, удлиненный

праймер, зонд или продукт лигирования кондиционируют путь модификации фосфодиэфирного скелета.

22. Способ по п. 21, отличающийся тем, что модификация фосфодиэфирного скелета представляет катионный обмен.

23. Способ по п. 20, отличающийся тем, что праймер, удлиненный праймер, зонд или продукт лигирования кондиционируют путем контакта с алкилирующим агентом или хлоридом триалкилсилила.

24. Способ по п. 20, отличающийся тем, что праймер, удлиненный праймер, зонд или продукт лигирования кондиционируют с помощью по крайней мере, одного нуклеотида, который уменьшает чувствительность к депуринизации.

25. Способ по п. 24, отличающийся тем, что нуклеотидом является N 7 - или N 9 - деазапуриннуклеотид или 2' фтор 2' дезоксинуклеотид.

26. Способ по пп.1-6, отличающийся тем, что машинная нуклеотидная последовательность указывает на болезнь или состояние, выбираемое из группы, включающей генетическую болезнь, хромосомную аномалию, генетическую предрасположенность, рак или инфекцию.

27. Способ по п.6, отличающийся тем, что первый или второй аддукт лигирования для каждой нити ДНК содержит 5'-фосфат.

28. Способ по п.6, отличающийся тем, что его осуществляют циклически с получением амплифицированного продукта лигирования, по которому осуществляют детекцию.

29. Способ по п.6, отличающийся тем, что лигаза является термостабильной ДНК лигазой.

30. Способ по пп.1-6, отличающийся тем, что масс-спектрометрия представляет связанную с матриксом лазерную десорбцию (МА ДЛ).

ПРИЛОЖЕНИЕ